

使用 Agilent Infinity II 1260 Prime/InfinityLab LC/MSD iQ 液质联 用系统对植物大麻素进行定量分析

作者

Sue D'Antonio¹, Guannan Li¹,
Anthony Macherone^{1,2}

¹ 安捷伦科技有限公司

² 约翰霍普金斯大学医学院,
Baltimore, MD, USA

摘要

从监管测试和法医角度来看，确定大麻或火麻及其衍生产品中 Δ^9 -四氢大麻酚 (THC)、大麻二酚 (CBD)、 Δ^9 -四氢大麻酚酸 (THCA) 及其他植物大麻素的浓度至关重要。无论所需的结果和信息如何，分析测试过程都基本相同。在本应用简报中，我们将 Agilent Infinity II 1260 Prime 液相色谱系统与 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 联用，分析了用于宠物行业的 CBD 油产品。结果展示了出色的色谱分离度、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

前言

2017 年，全球大麻市场估值为 39 亿美元，预计到 2025 年，大麻籽市场将“以 17.1% 的复合年增长率 (CAGR)”^[1] 持续增长。受大麻生产影响的行业包括保健品、食品、纺织、建筑材料和个人护理用品等行业。随着美国、加拿大以及其他国家/地区消遣用和药用大麻市场的蓬勃发展，可以预见，大麻二酚（一种非精神活性大麻素）的产量还将继续增加。

在万维网上简单搜索，就能找到数百种宠物用大麻产品和 CBD 油产品。目前，美国农业部只要求对大麻进行效价测试，以确保大麻和大麻制品的总 THC 含量低于 0.3%（按重量计）。在大多数监管实验室中，通常使用 HPLC-UV 来分离和检测各种产品中的大麻素。但是，CBD 油通常含有萜烯等共洗脱化合物，使用紫外检测器时，这些化合物可能会干扰目标大麻素

的准确鉴定和定量分析。在我们的工作中增加 LC/MSD iQ 可以提高质量确认的特定性，减少上述干扰并大幅提高方法的整体可靠性。

随着公众对 CBD 油和相关产品的关注不断增加，制造商、经销商和研究人员必须准确测定 CBD 和 THC 的单独浓度以及总 THC 和总 CBD 含量，定义如下：

$$\text{总 THC} = 0.877 \times [\text{THCA}] + [\text{THC}]$$

公式 1.

$$\text{总 CBD} = 0.877 \times [\text{CBDA}] + [\text{CBD}]$$

公式 2.

式中，[THCA] 为 THC 酸类似物浓度，[CBDA] 为 CBD 酸类似物浓度。值得注意的是，大麻基因组编码 THCA、CBDA 等植物大麻素酸的生物合成，而 THC、CBD 等则是在收获、干燥和加热过程中产生的。

实验部分

硬件和软件

使用 Agilent InfinityLab LC/MSD iQ 系统开展所有实验，该系统包括以下模块：

- Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)
- 1260 Infinity II 样品瓶进样器（带 40 μL 计量装置、20 μL 定量环的 G7129A 和 G7129C），配备集成式柱温箱（3 μL 加热器；G7130-64430）和集成式样品冷却器
- 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)
- InfinityLab LC/MSD iQ (G6160AA)

使用 Agilent OpenLab CDS 软件（2.4 版）进行数据采集和处理。

数据采集

除 SIM 离子之外的所有 MSD 参数均由 LC/MSD iQ 使用自动采集模式自动设置。自动采集模式根据 HPLC 的色谱设置（如流速）设定 MS 参数。LC/MSD iQ 分析参数见下表。

表 1. HPLC 条件

参数	值
流速	0.5 mL/min
色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 1.9 μm
停止时间	12.5 分钟
后运行时间	3.0 分钟
进样量	0.5 μL
波长	228 nm 和 270 nm
采集速率	40 Hz

表 2. HPLC 流动相梯度

时间	(A) 100% H ₂ O	(B) 100% ACN	(C) 100% MeOH	(D) 1 mL 甲酸溶于 1 L 水
0	25	70	0	5
3.2	25	70	0	5
8.2	5	0	90	5

表 3. 使用自动采集进行 LC/MSD iQ 采集设置

采集模式	自动
调谐文件	atunes.tune
离子源	ESI
启用时间过滤器	开
启用目标点	开
% SIM	50

表 4. LC/MSD iQ 电喷雾离子源条件

离子源参数	值
干燥气温度	325 °C
气体流速	13 L/min
雾化器	55 psig
毛细管电压	3500

表 5. iQ SIM/Scan 参数

细分	名称	M+H (m/z)	碎裂电压 (V)	极性
SCAN		200–700	100	正离子
SIM	THCA 和 CBDA	359.2	100	正离子
SIM	CBN	311.2	100	正离子
SIM	CBD、THC 和 CBC	315.2	100	正离子
SIM	CBG	317.2	100	正离子
SIM	CBDV 和 THCV	359.2	110	正离子
SIM	CBGA	361.2	110	正离子

色谱柱与备件

表 6. 安捷伦备件及部件号

消耗品	部件号
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 mm × 100 mm, 1.9 μm	695675-302
0.45 μm 再生纤维素 (RC) 针头过滤器	5190-5107
甲酸	G2453-85060
InfinityLab LCMS 级超纯水, 1 L	5191-4498
InfinityLab LC/MS 级超纯甲醇, 1 L	5191-4497
InfinityLab 乙腈, 1 L	5191-4496
陶瓷均质子, 50 mL 管, 100/包	5982-9313
5 mL 一次性注射器, 100/包	9301-6476

样品前处理

移取 100 μL 均质样品至 10 mL 去皮重的容量瓶中，准确称重并记录。向容量瓶中加入 5 mL 高纯度己烷，盖上瓶塞，简单涡旋混合。向容量瓶中继续加入己烷至 10 mL 刻度线，然后再次混合（稀释 100 倍）。取 100 μL 稀释的样品油转移至新样品瓶，加入 900 μL 乙醇。盖上样品瓶盖，简单混合，用 0.45 μm 再生纤维素 (RC) 针头过滤器过滤，并转移至 2 mL 自

动进样器进样瓶中以备分析。总稀释倍数为 1000。请注意，稀释倍数应根据所分析产品的 CBD 含量相应增加或减小。

用溶剂对表 7 所示的 11 种大麻素的混合物进行连续稀释，配制 5 种不同浓度的校准溶液，浓度范围为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在低校准浓度下重复进样以确定 LOD 和 LOQ。

利用公式 3 进行重量/体积换算。

结果与讨论

1260 Infinity II Prime LC 四元泵具有类似于二元泵的梯度曲线，因此可以使用四种不同的溶剂。这样一来，分析人员无需再配制复杂的流动相，并且流动相可以得到快速补充。在 5% 总流动相下使用 D 通道 (0.1% 甲酸)，离子强度和 UV 基线吸收保持不变。由于 HPLC 泵和组件最大耐压为 800 bar，因此可以使用 1.9 μm Poroshell 色谱柱，以获得小颗粒填料的分离优势。所以，整个分析均能获得出色的色谱分离度。图 1 显示了 SIM 和 UV 色谱图。表 8 显示了每种化合物的 LOD 和 LOQ 计算值。LOD 为 3 倍信噪比，LOQ 为 10 倍信噪比。最后，表 9 给出了 6 种市售宠物产品的定量结果。

表 7. 目标大麻素和保留时间 (min)

化合物	缩写	保留时间
次大麻二酚	CBDV	2.676
大麻二酚酸	CBDA	3.693
大麻萜酚酸	CBGA	3.979
大麻萜酚	CBG	4.267
大麻二酚	CBD	4.554
四氢次大麻酚	THCV	4.941
大麻酚	CBN	7.198
Δ^9 -四氢大麻酚	Δ^9 -THC	8.290
Δ^8 -四氢大麻酚	Δ^8 -THC	8.590
大麻环萜酚	CBC	9.173
Δ^9 -四氢大麻酚酸	THCA	9.795

$$\text{大麻素浓度 (\% wt/wt)} = \left[\frac{\text{浓度计算值} \cdot V \cdot D}{M \cdot 10000} \right]$$

公式 3.

浓度计算值 = 通过线性回归分析得出的分析物浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

V = 样品稀释剂初始体积 (mL)

D = 稀释倍数

M = 样品质量 (g)

10000 = 由 $\mu\text{g}/\text{g}$ 换算为 % wt/wt

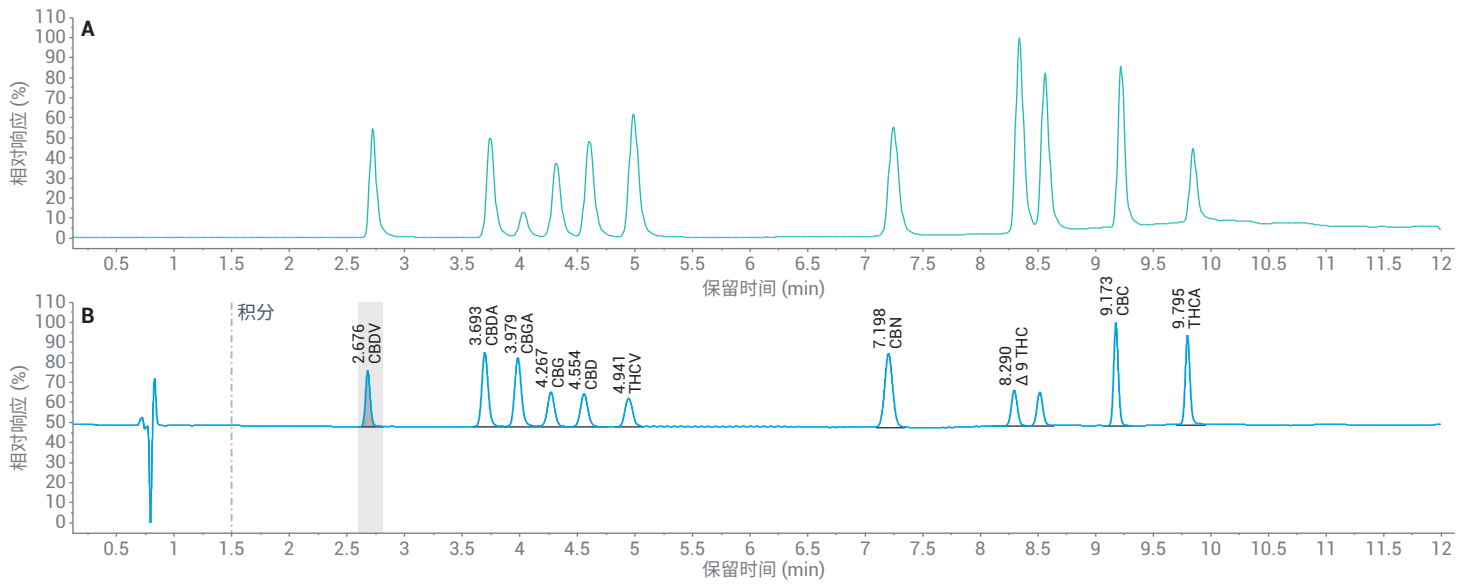


图 1.11 种化合物的混标的归一化 SIM TIC (A) 和 DAD 信号 (B)。浓度单位为 $\mu\text{g/mL}$

表 8. 校准范围为 0.1–50 $\mu\text{g/mL}$ 的相关系数 (R^2), 以及 LOD 和 LOQ 结果

化合物	R^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
CBDV	0.995	0.25	0.50
CBDA	0.996	0.25	0.50
CBGA	0.997	0.25	0.50
CBG	0.997	0.25	0.50
CBD	0.999	0.25	0.50
THCV	0.995	0.25	0.50
CBN	0.997	0.25	0.50
Δ^8 -THC	0.990	0.10	0.50
CBC	0.995	0.25	0.50
THCA	0.995	0.25	0.50
Δ^9 -THC	0.992	0.10	0.25

表 9. 六种市售宠物用 CBD 油的定量结果计算值 ($\mu\text{g/mL}$)

样品编号	CBD	CBDA	THCA	Δ^9 -THC	Δ^8 -THC	CBG	CBN	CBC	CBDV	THCV
1MS	191.0	2.0	未检出	6.9	未检出	6.6	未检出	9.5	2.0	未检出
2MS	67.9	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
3MS	23.2	2.2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
4MS	2.3	0.8	3.1	1.2	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
5MS	34.7	3.7	未检出	0.2	未检出	未检出	未检出	1.7	未检出	未检出
6MS	17.0	未检出	未检出	0.8	未检出	未检出	未检出	1.9	未检出	未检出

结论

与单独的 UV 检测相比，1260 Infinity II Prime LC 与 LC/MSD iQ 的联用系统不仅简便易用，还为大麻素产品（例如宠物用 CBD 油）分析提供了更高的选择性。本研究所述的分析方法确定了六种产品中是否存在 11 种大麻素，并对发现的大麻素进行了准确的定量分析。这是通过各种目标化合物出色的色谱分离度和 m/z 离子质谱确认实现的。此方法可用于特许实验室进行大麻和大麻素产品合规性测试（药用和成人消遣用大麻和大麻产品已合法化的情况下），也可用于已在美国缉毒局 (DEA) 注册的法医和犯罪学实验室，以确保大麻符合美国农业部的指南要求。

参考文献

1. Grand View Research (2018 年 6 月), *Industrial Hemp Market Size, Share & Trends Analysis Report by Product (Seeds, Fiber, Shivs), By Application (Textiles, Personal Care, Animal Care, Construction Materials), By Region, And Segment Forecasts, 2018 – 2025*, 2019 年 3 月 20 日访问: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-hemp-market>

表 10. 总 CBD 和 THC (% wt/wt)

样品编号	总 CBD (% wt/wt)	总 THC (% wt/wt)
1MS	22.1	2.53
2MS	7.8	未检出
3MS	2.9	未检出
4MS	0.3	0.04
5MS	4.3	0.50
6MS	1.9	未检出

www.agilent.com

安捷伦产品和解决方案旨在帮助实验室进行大麻质量控制和安全检测（在国家/地区法律允许的情况下使用）。

DE.3209953704

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2020
2020 年 3 月 31 日，中国出版
5994-1706ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278（手机用户）

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

